



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1463号
学位記番号	第1049号
氏名	片野 敬仁
授与年月日	平成 27 年 3 月 25 日
学位論文の題名	<p>Gastric mesenchymal myofibroblasts maintain stem cell activity and proliferation of murine gastric epithelium in vitro (胃間質筋線維芽細胞は胃の組織幹細胞機能と上皮細胞の増殖能の維持に関与する)</p> <p>The American Journal of Pathology. 2015 Mar;185(3):798-807</p>
論文審査担当者	主査： 竹山 廣光 副査： 澤本 和延, 城 卓志

論文内容の要旨

[背景]

幹細胞研究の進歩に伴い、様々な組織における組織幹細胞の局在、分化過程が明らかとなってきたが、胃においては未解明な点が多いのが現状である。これは従来、正常胃粘膜上皮の培養が困難であり、幹細胞や前駆細胞からの分化過程を確認することを可能とする適切な培養法が存在しなかったことが一因である。そこでわれわれは 自己複製能と多分化能という幹細胞機能を維持し、正常胃腺管の分化、増殖過程を模倣する三次元培養系を構築した。幹細胞機能維持に必要な微小環境をニッチと呼ぶが、胃腺管においては間質の筋線維芽細胞もニッチのひとつとされている。樹立した三次元培養系を用いて、胃の組織幹細胞や正常胃腺管の分化、増殖過程に及ぼすニッチとしての筋線維芽細胞の機能を検討した。

[方法]

- (1) 生後 2 日齢のマウス (C57BL/6J) の腺胃を摘出し、1mm³ 未満の切片に氷上でミンチし、コラーゲンゲル内に包埋して air-liquid interface の環境下で三次元的に培養し顕微鏡下に観察した。コラーゲンゲル内で培養された細胞をホルマリン固定の後、パラフィンに包埋し、薄切を行い、病理組織および免疫組織学的検討を行った。
- (2) 生後 2 日齢のマウス (C57BL/6J) の腺胃から組織間質筋線維芽細胞を単離培養し、三次元培養下での胃の組織幹細胞機能や上皮の分化、増殖過程への影響を検討した。
- (3) また、小腸からも組織間質筋線維芽細胞を単離培養し、リアルタイム PCR を用いて胃・小腸それぞれの組織間質筋線維芽細胞における 46 遺伝子の mRNA 発現を比較、検討した。

[結果]

- (1) 腺胃細胞はコラーゲンゲル内で外周を紡錘状の細胞に裏打ちされながら sphere を形成し、成長するのが観察された。H&E 染色では、sphere 内腔は粘液を有する単層の円柱上皮によって構成されていた。免疫染色にてこれらの粘液を有する円柱細胞は MUC5AC および human gastric mucin (HGM) 陽性であり、表層粘液細胞への分化が示された。また一部には内分泌細胞への分化を示す chromogranin A 陽性細胞も認めた。Sphere の外周を取り巻く紡錘形の細胞は α -smooth muscle actin (SMA) 陽性であり、培養された胃上皮細胞が間質を含む生体内の環境を再現していた。筋線維芽細胞の裏打ちの得られない sphere は培養開始後早期に消退し、筋線維芽細胞の十分な裏打ちを得た sphere のみが成長を続けられ、sphere の成長には上皮を裏打ちする筋線維芽細胞の構築が必須であった。
- (2) マウス腺胃から単離培養した組織間質筋線維芽細胞 (GMF) 細胞株は免疫染色で α -SMA および vimentin 陽性を示し、生体内の間質筋線維芽細胞と同様の染色を示し、各種上皮細胞のマーカーにはいずれも陰性を示した。この GMF 細胞株を三次元培養システムのコラーゲンゲル内に共培養したところ、培養 20 日において sphere の数、大きさ共にコントロールに比し有意に上昇した。GMF との共培養 20 日における sphere での免疫染色において、表層粘液細胞、頸部粘液細胞、神経内分泌細胞への分化を示す所見が得られた。培養 20 日での GMF 共培養での sphere の上皮細胞における Ki67 陽性細胞率はコントロールに比し有意に高く、また in situ ハイブリダイゼーションでは培養 2 ヶ月以上の sphere においても幹細胞マーカー Lgr5 陽性細胞を検出できた。
- (3) Gas1 発現が胃間質筋線維芽細胞に有意に高く、Hoxc8、Notch1、Sox10 発現が小腸間質筋線維芽細胞で有意に高かった。

[結論]

長期間にわたり正常胃腺管の分化増殖過程を模倣する *in vitro* 培養系を確立し、三次元培養内で胃間質筋線維芽細胞が胃の組織幹細胞機能および上皮の増殖能維持に関与していることを示した。胃・小腸の間質筋線維芽細胞にも組織特異性が存在することも示唆された。この三次元培養システムは正常の正常胃粘膜の分化過程や上皮間質相互作用のメカニズムの解明に有用であり、消化管再生医療への応用が期待できる。

論文審査の結果の要旨

【背景と目的】

従来、正常胃粘膜上皮の培養が困難であり、幹細胞や前駆細胞からの分化過程を確認することを可能とする適切な培養法が存在しなかったことから、胃上皮における組織幹細胞の局在、分化過程は未解明な点が多いのが現状である。申請者らは自己複製能と多分化能という幹細胞機能を維持し、正常胃腺管の分化、増殖過程を模倣する三次元培養系を構築し、樹立した三次元培養系を用いて、胃の組織幹細胞や正常胃腺管の分化・増殖過程に及ぼすニッチとしての筋線維芽細胞の機能を検討した。

【方法と結果】

生後2日齢のマウス (C57BL/6J) の腺胃をコラーゲングル内に包埋して air-liquid interface の環境下で三次元的に培養を行った。腺胃細胞はコラーゲングル内で外周を紡錘状の細胞に裏打ちされながらスフェアを形成し、成長するのが観察された。H&E 染色では、スフェア内腔は粘液を有する単層の円柱上皮によって構成され、腺管様の構造も観察された。スフェアの外周を取り巻く紡錘形の細胞は α -smooth muscle actin (SMA) 陽性であり、培養された胃上皮細胞が間質を含む生体内の環境を再現していた。スフェアの成長には上皮を裏打ちする筋線維芽細胞の構築が必須であった。マウス腺胃から単離培養した組織間質筋線維芽細胞 (GMF) 細胞株は免疫染色で α -SMA および vimentin 陽性を示し、生体内の間質筋線維芽細胞と同様の染色を示し、各種上皮細胞のマーカーにはいずれも陰性を示した。この GMF 細胞株を三次元培養システムのコラーゲングル内に共培養したところ、培養20日においてスフェアの数、大きさ共にコントロールに比し有意に上昇した。GMF との共培養20日におけるスフェアでの免疫染色において、表層粘液細胞、頸部粘液細胞、内分泌細胞への分化という胃上皮の多方向への分化の所見が得られた。培養20日での GMF 共培養でのスフェアの上皮細胞における Ki67 陽性細胞率はコントロールに比し有意に高く、生体内に近似した増殖能が長期間に維持されていた。また in situ ハイブリダイゼーションでは培養2ヶ月以上のスフェアにおいても幹細胞マーカー Lgr5 陽性細胞を検出でき、三次元培養内で長期間に幹細胞機能が維持されていることを示した。胃・小腸の間質筋線維芽細胞のリアルタイム PCR の検討において、Gas1 発現が胃間質筋線維芽細胞に有意に高く、Hoxc8、Notch1、Sox10 発現が小腸間質筋線維芽細胞で有意に高かった。

【結論】

長期間にわたり正常胃腺管の分化増殖過程を模倣する in vitro 培養系を樹立した。間質を含めた生体内の環境を再現可能であり、三次元培養内で多方向への胃上皮の分化を確認できた。胃間質筋線維芽細胞との共培養が胃の組織幹細胞機能および上皮の増殖能維持に有利であった。胃・小腸の間質筋線維芽細胞にも組織特異性が存在することも示唆された。この三次元培養システムは消化管幹細胞研究への応用から、組織恒常性維持機構の解明、種々の胃疾患の病態解明への寄与が期待できる。

【審査の内容】

先ず約15分にわたるプレゼンテーションが行われたのち、主査(竹山)としては、今回樹立した三次元培養システムについて、コラーゲングルの組成やコラーゲングル層の構築方法を含めた実験手順や、実験結果に関する質問を行った。また副査の澤本教授からは、幹細胞や幹細胞ニッチの定義、現在同定されているニッチシグナルについての知見、Lgr5 と幹細胞機能との関連などの基礎的な知識の質問とともに、論文に記載された内容の解釈、実験で用いた薬剤の意義、研究結果の今後の応用について幅広い質問がなされた。これらの質疑応答から、論文内容を理解していると判断され、本人によって遂行された研究であることも確認できた。第二副査の城教授からは、研究内容の他に専門領域における臨床的な観点からの質問(食道癌の診断治療など)があり、いずれの質問に対しても的確な返答がなされた。

本論文では、自己複製能と多分化能を保持した正常胃腺管の長期間培養に初めて成功し、胃腺管の分化増殖過程を再現することで胃間質筋線維芽細胞の組織幹細胞機能維持と上皮の増殖能維持に対する相互作用を明らかにした。胃癌の発生母地とされる腸上皮の発生メカニズムや再生医療にも貢献できる新しい内容と考えられるため、本論文の著者は博士(医学)の学位を授与するに相応しいと判断した。